

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/54, C12P 19/30, C12N 9/90, C12Q 1/48, C12N 9/12		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/27670 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. September 1996 (12.09.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00371 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. März 1996 (01.03.96) (30) Prioritätsdaten: 195 07 449.1 3. März 1995 (03.03.95) DE 195 17 093.8 15. Mai 1995 (15.05.95) DE 196 06 651.4 23. Februar 1996 (23.02.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, D-52425 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RITTER, Jörg, Eberhard [DE/DE]; Keltenstrasse 23, D-52382 Niederzier (DE). ELLING, Lothar [DE/DE]; Am Römerhof 18B, D-52066 Aachen (DE). KULA, Maria-Regina [DE/DE]; Selgenbusch 12, D-52382 Niederzier (DE). VERSECK, Stefan [DE/DE]; Kipdorf 5, D-42103 Wuppertal (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, D-52425 Jülich (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: ENZYMATIC PROCESS FOR PRODUCING GDP-ALPHA-D-MANNOSE, A GDP MANNOSE PYROPHOSPHORYLASE AND PHOSPHOMANNOMUTASE SUITABLE FOR THAT PROCESS, THE EXTRACTION OF THE SAID ENZYMES, AND AN ENZYME TEST

(54) Bezeichnung: ENZYMATISCHES VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON GDP- α -D-MANNOSE, DAFÜR GEEIGNETE GDP-MANNOSE-PYROPHOSPHORYLASE UND PHOSPHOMANNOMUTASE UND DEREN GEWINNUNG SOWIE ENZYMTEST

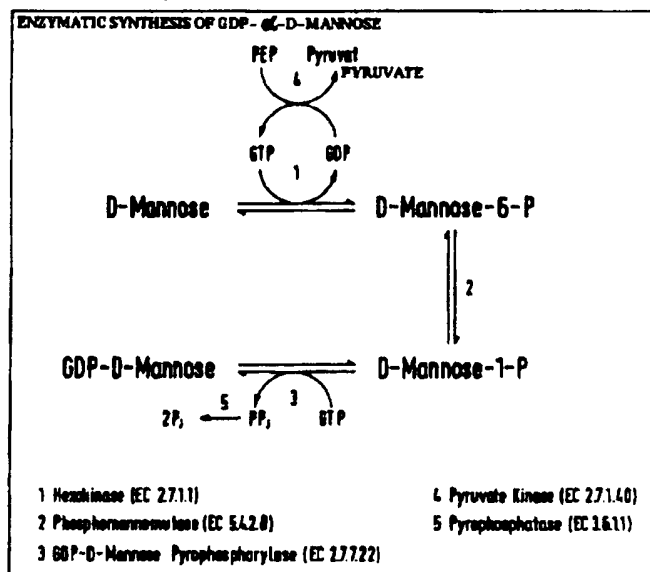
(57) Abstract

The invention concerns a GDP-mannose-pyrophosphorylase. The aim of the invention is to produce a GDP-mannose-pyrophosphorylase which can be obtained for an acceptable outlay and does not cause problems, in particular because of its monofunctionality, in continuous multiple stage processes. To that end, a mannose- or mannose-derivative-specific GDP-mannose-pyrophosphorylase, which can be isolated from microorganisms and has a specific activity of ≥ 2 U/mg, is prepared.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine GDP-Mannose-Pyrophosphorylase. Ziel der Erfindung war eine mit wirtschaftlich tragbarem Aufwand erzielbare GDP-Mannose-Pyrophosphorylase, die insbesondere wegen ihrer Monofunktionalität in kontinuierlichen mehrstufigen Prozessen über längere Zeit nicht zu Problemen führt. Zu diesem Zweck wird eine Mannose- bzw. mannosederivatspezifische, aus Mikroorganismen isolierbare GDP-Mannose-Pyrophosphorylase mit einer spezifischen Aktivität ≥ 2 U/mg bereitgestellt.

Enzymatische Synthese von GDP- α -D-Mannose



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

B e s c h r e i b u n g

Enzymatisches Verfahren zur Herstellung von GDP- α -D-Mannose, dafür geeignete Enzyme und deren Gewinnung sowie Enzymtest

5 Gegenstand der Erfindung ist eine neue bezüglich des Hexoserests monofunktionelle GDP-Mannose-Pyrophosphorylase (GDPMan-PP) mikrobiellen Ursprungs mit einer spezifischen Aktivität ≥ 2 U/mg und sie umfaßt ein Verfahren zur Gewinnung derselben sowie deren Verwendung zur Herstellung von GDP-Mannose.

10 Die GDP-Mannose gehört zu den derzeit umfänglich untersuchten aktivierten Zuckern, die mit Glycosyltransferasen zu Oligosacchariden umgesetzt werden können. Sie bildet außerdem das Ausgangsmaterial für die Gewinnung von GDP-Fucose.

15 Die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase ist seit langem bekannt. Sie kann aus unterschiedlichen Quellen isoliert werden: So wurde bereits 1964 von Preiss u.a. (J.Biol. Chem. 239 (1964) 3119-26) über die Isolierung des Enzyms aus *Arthrobacter* sp. berichtet. D.Shinabarger u.a. (J.Biol. Chem. 266 (1991) 2080-88) beschreiben die Iso-
20 lierung einer multifunktionellen GDP-Man-PP aus *Pseudomonas aeruginosa* mit Phosphomannose-Isomerase- und Pyrophosphorylase-Aktivität.

Eine aus Säugetier-Drüsen isolierte GDP-Man-PP katalysiert sowohl die Synthese von GDP-Mannose als auch von GDP-Glucose. Aus Schweineschilddrüsen wurde eine
5 70.000-fach aufgereinigte CDP-Man-PP gewonnen, die keine GDP-Glucose-Synthese-Aktivität zeigte.

T. Szumilo u.a. (J. Biol. Chem. 268 (1993) 17943-50) berichten über die Isolierung und 5000-fache Aufreinigung von GDP-Man-PP aus Schweineleber, wobei aus 1 kg
10 Leber 4 mg Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 9,25 U/mg in mehrstufiger Reinigung erzielt wurden. Auch dieses Enzym katalysiert sowohl die Bildung von CDP-Mannose als auch von GDP-Glucose.

15 In jüngerer Zeit dient als GDP-Man-PP-Quelle vornehmlich Hefe (*S. cerevisiae*), und das Enzym wird im allgemeinen nicht besonders aufgereinigt (P.Wang u.a. in J. Org. Chem. 58 (1993) 3985-90). In der W093/0820 A1 wird
20 über eine Anreicherung von GDP-Man-PP aus Hefe berichtet, bei der aus einem Hefezell-Extrakt durch fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung und Dialyse eine Enzymlösung mit einer Aktivität von 0,1 U/ml erhalten wurde.

25 Zusammenfassend kann mithin festgestellt werden, daß die kommerziell nicht verfügbare GDP-Man-PP entweder mit sehr großem Aufwand isoliert oder in nicht oder nur teilgereinigter Form eingesetzt worden ist, wobei unterschiedliche Formen mit z.T. Multifunktionalitäten
30 vorlagen.

Ziel der Erfindung ist daher eine mit wirtschaftlich tragbarem Aufwand erzielbare GDP-Man-PP, die insbesondere auch wegen ihrer Monofunktionalität in kontinuierlichen mehrstufigen Prozessen über längere Zeiten nicht zu Problemen führt.

Die zu diesem Zweck entwickelte GDP-Man-PP entspricht dem Patentanspruch 1.- Weitere Besonderheiten der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die GDP-Man-PP wird insbesondere aus einem rekombinanten Stamm von Mikroorganismen wie Hefen, B. subtilis- und E. coli-Stämmen sowie ggf auch Zelllinien animalischen Ursprungs, die zur gentechnologischen Modifikation unter Bildung von Produktionsstämmen geeignet sind und in die gentechnologisch manipulierte Plasmide der an sich bekannten Art aber mit dem für die gewünschte Bildung von GDP-Man-PP kodierenden Gen eingeschleust sind, gewonnen, in dessen Rohextrakt das Enzym bereits in erheblicher Konzentration vorhanden ist, so daß der Aufwand für die Aufarbeitung und Reinigung im Hinblick auf eine gewerbliche Produktion durchaus tragbar wird.

Die nachstehende Tabelle zeigt die in unterschiedlichen Enzymquellen vorhandenen Enzymgehalte im Rohextrakt, die nach Aufreinigung erhaltenen spezifischen Aktivitäten (soweit bekannt) und die Funktionalität des erhaltenen Enzyms.

Vergleich der Enzymquellen für GDP-Mannose Pyrophosphorylase

Enzymquelle	Spezifische Aktivitäten Rohextrakt (U/mg Protein)	Spezifische Aktivität nach Reinigung (U/mg Protein)	Bemerkung zur Spezifität bzw. Funktionalität
Hefe (nach Munch-Petersen 1962)	0,0167	1,32	Mannose-1- Phosphat
Schweineleber (nach Szumilo et al. 1993)	0,0019	9,25	(Glucose-1- Phosphat und Mannose-1- Phosphat
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Shinabarger et al. 1991)	0,397	6,12	Bifunktionelles Enzym aus GDP- Man-PP und Phosphomannose isomerase
<i>Escherichia coli</i> (Wildstamm) eigene Messung mit NUSSA	0,0034		
Rekombinanter <i>E. coli</i> Stamm erfindungsgemäß	0,370	2,3	Mannose-1- Phosphat
Literatur:	A. Munch-Petersen (1962) Meth. Enzymology Vol. V, 171-174. Szumilo et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 17943-17950. Shinabarger et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 2080-2088.		

Man erkennt deutlich die Überlegenheit der erfindungs-
gemäßen Strategie der Bereitstellung einer ergiebigen
Enzymquelle für ein monofunktionelles ("mannose-
spezifisches") Enzym.

Dieses Enzym ist für die Gewinnung von GDP-Mannose in
größeren Mengen einsetzbar, wobei zweckmäßigerweise von
dem billigeren Mannose-6-Phosphat ausgegangen wird, das
zunächst mit Hilfe von Phosphomannomutase in Mannose-1-
Phosphat umgewandelt wird.

Sowohl GDP-Man-PP als auch Phosphomannomutase werden insbesondere ausgehend von Produzenten-Stämmen erhalten, welche die entsprechende Gene (rfbM bzw. rfbK) nach Inserierung derselben in ein Plasmid und Einschleusung desselben in den jeweiligen Produzenten-Stamm enthalten, gemäß folgender Strategie:

1. Amplifikation der Gene mit PCR (Vent-Polymerase)

- Nach chemischer Synthese von Primer anhand der bekannten Gensequenzen werden die Gene mittels PCR mit der Vent-Polymerase amplifiziert.

2. Klonierung der Gene in das Plasmid pUC18

(blunt-end mit Enzym Sma I)

Anzucht in E. coli DH5 α

- Nach Auftrennung der amplifizierten Gene in einem Agarosegel und Isolation der Gene aus diesem Gel werden die Gene jeweils mit dem Vektor pUC18 ligiert (gekoppelt), der zuvor mit Sma I (Restriktionsenzym) zur stumpfendigen (blunt-end) Linearisierung hydrolysiert wurde. Die ligierten Vektoren werden in einen für die DNA-Aufnahme vorbereiteten Stamm E. coli DH5 α transformiert und die Zellen auf einem festen Nährmedium aufgezogen.
- Die positiven, transformierten Kolonien (weiße Kolonien auf der Agarplatte) werden isoliert und erneut wie oben angezogen.

3. Klonierung der Gene in den Expressionsvektor pT7-6
über EcoRI und BarnHI Schnittstellen
Anzucht in E. coli BL21(DE3)

5

- Aus den positiven Transformanden wird das Plasmid
(Plasmid pUC18 + inseriertes Gen rfbM oder rfbK) iso-
liert, mit den Enzymen EcoRI und BarnHI hydrolysiert.
Ebenso wird der Expressionsvektor pT7-6 mit den Enzy-
men EcoRI und BamHI hydrolysiert.
- 10
- Nach der Ligation von pT7-6 mit dem isolierten Gen
rfbM oder rfbK wird ein zur DNA-Aufnahme vorbereite-
ter Stamm von E. coli BL21 (DE3) mit diesen jeweils
15 transformiert. Die Transformanden werden auf festem
Nährmedium angezogen.
- Nach Isolation von einzelnen Kolonien und erneuter
Anzucht auf einem festen Nährmedium wird zur Kontrol-
le das jeweilige Plasmid mit dem jeweiligen Gen iso-
liert und hydrolysiert.
- 20
- Die positiven Transformanden werden erneut auf einem
festen Nährmedium angezogen und anschließend konser-
viert.
- 25

Nachfolgend wird die Erfindung mehr im einzelnen und
anhand spezieller Ausführungsdetails erläutert.

Die Biosynthese aktivierter Zucker, insbesondere GDP-alpha-D-Mannose, verläuft in vivo oft ausgehend von einem Monosaccharid (zum Beispiel Mannose), das an C6 phosphoryliert wird. Das Zucker-6-Phosphat (zum Beispiel Mannose-6-Phosphat) wird mit Hilfe einer Phosphomutase (EC 5.4.), insbesondere hier eine Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8), umgesetzt in ein Zucker-1-Phosphat.

10 Mannose-6-Phosphat Mannose-1-Phosphat (I)

Pyrophosphorylasen, die zu den Nucleotidyltransferasen gehören (EC 2.7.7), insbesondere hier die GDP-alpha-D-Mannose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.13) katalysieren den Transfer einer Nucleotidylgruppe von einem Nucleosidtriphosphat auf ein Zucker-1-Phosphat unter Freisetzung von anorganischem Pyrophosphat (siehe Feingold und Barber, 1990, in Methods in Plant Biochem. 2, 39-78), insbesondere die folgende Reaktion (II)

20 Mannose-1-Phosphat + GTP GDP-Mannose + PP_i (II)

Pyrophosphorylasen stellen Zuckernucleotide als Substrate für Glycosyltransferasen (EC 2.4.), die den Zuckeranteil auf einen Akzeptor übertragen (siehe z.B. Ginsberg, V. (1964) in Adv. Enzymol. 26, 35-88, oder zur Synthese anderer sekundärer aktivierter Zucker, insbesondere hier die GDP-β-L-Fucose, bereit (Yamamoto, K., 1982, in Agric. Biol. Chem. 48, 823-824 und 1993, in Arch. Biochem. Biophys. 300, 694-698).

Da die chemische Synthese oftmals schwierig und mit niedrigen Ausbeuten verbunden ist, findet die enzymatische Synthese immer mehr Anwendung.

Die Phosphomannomutase (EC 5-4.2.8) und die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.13) wurden bisher
5 in verschiedenen Quellen nachgewiesen.

Die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase wurde erstmals 1956 von Munch-Petersen aus Bäcker-Hefe partiell isoliert, wobei die Menge an verfügbarem Enzym je nach Hefecharge
10 stark schwankte (Munch-Petersen, 1956, Acta Chem. Scand. 10, 928). Das Enzym wurde 1962 von Preiss und Wood (in J. Biol. Chem. 239 (10), 3119-3126) aus *Arthrobacter* sp. isoliert. Die Autoren konnten jedoch nicht ausschließen, daß die zahlreichen umgesetzten ak-
15 tivierten Zucker nicht auf Nebenreaktionen anderer Pyrophosphorylasen zurückzuführen sind. In *Pseudomonas aeruginosa* und *Rhodospirillum rubrum* wurde ein bifunktionelles Enzym, GDP-Mannose-Pyrophosphorylase gekoppelt mit Phosphomannose-Isomerase-Aktivität, gefunden
20 (Shinabarger et al., 1991, in J. Biol. Chem. 266 (4), 2080-2088 und Ideguchi et al., 1993, in Biochimica et Biophys. Acta 1172, 329-331). Auch aus eukaryotischen Quellen wurde die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase isoliert (Szumilo et al., 1993 in J. Biol. Chem. 268
25 (24), 17943-17950). Die festgestellten Aktivitäten, Umsatz zu GDP-Glucose (100%), IDP-Glucose (72%) und GDP-Mannose (61%), lassen vermuten, daß es sich eher um eine GDP-Glucose-Pyrophosphorylase handelt (EC 2.7.7.34).

30 Die Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8) wurde bisher nur im Zusammenhang mit der Alginat-Biosynthese betrachtet

(Sá-Correia et al., 1987, in J. Bacteriol. 169, 3224-3231 und Goldberg et al., 1993, in J. Bacteriol. 175 (3), 1605-1611).

- 5 Die enzymatische Synthese von GDP-Mannose wurde bisher von Simon et al., 1990 in J. Org. Chem. 55, 1834-1841, Wong et al., 1993 in WO 93/0820, Wang et al., 1993 in J. Org. Chem. 58, 3985-3990 und Palanka und Turner, 1993 in J. Chem. Soc. Perkin Trans 23 (1), 3017-3022, 10 beschrieben. Diese Arbeitsgruppen verwenden alle eine, nach der von Munch-Petersen 1956 beschriebenen Methode, aus Hefezellen gewonnene Proteinpräparation und synthetisieren GDP-Mannose ausgehend von Mannose-1-Phosphat, das zuvor chemisch hergestellt wurde.
- 15 Durch Klonierung in einen (Produktions-) Expressionsvektor (Plasmid) (pT7-6 der Firma Novagen) und (Einführung) Transformation in einen (Produktionsstamm) Expressionsstamm *Escherichia coli* BL21(DE3)pLyss (der 20 Firma Novagen) wurde nunmehr eine Phosphomannomutase und GDP-Mannose-Pyrophosphorylase entwickelt, welche erfindungsgemäß in größeren Mengen gewonnen werden können, als aus den bisher bekannten Quellen (s. Tab., Seite 3). Beide Enzyme stammen aus *Salmonella enterica*, 25 Gruppe B (früher *Salmonella typhimurium* LT2). Die Gene (rfb M codiert für die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase; rfb K codiert für die Phosphomannomutase) liegen in dem rfb-Gen-Cluster, dessen Struktur und Sequenz von Jiang et al., 1991 in Mol. Microbiol. 5 (3), 695-713 aufge- 30 klärt wurde.

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden die Gene rfb M und rfb K vervielfältigt (amplifiziert) und je in einen Vektor pUC18 (Firma Novagen) kloniert. Ausgehend von diesem Vektor wurden die Gene rfb M und rfb K je in einen Expressionsvektor pT7-6 der Firma Novagen kloniert und je in einen Expressionsstamm Escherichia coli BL21(DE3)pLysS eingeführt (transformiert). Das Plasmid pT7-6 mit dem inserierten Gen rfb M wurde nunmehr pERJ-1 genannt. Das Plasmid pT7-6 mit dem inserierten Gen rfb K wurde pERJ-2 genannt (siehe Fig. 1 - 3).

Die Produktion (Expression) der von den Genen rfb M und rfb K codierten Proteine (GDP-Mannose-Pyrophosphorylase und Phosphomannomutase) wurde durch Isopropylthiogalactosid (IPTG) mit 0,4 mM induziert und mit 0,03 mM Rifampicin gesteigert (siehe Fig.4).

Durch mechanischen Aufschluß der Zellen (Escherichia coli) in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8 und 150 mM KCl und Zentrifugation (2 min bei 10000 rpm) wurde ein proteinhaltiger Rohextrakt gewonnen. Dieser Rohextrakt wurde auf einen Anionenaustauscher (Q-Sepharose FF) geladen und die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase durch eine Stufenelution mit 150 mM KCl und 400 mM KCl gewonnen. Das Eluat wurde mit 1 M Ammoniumsulfat und 20% Glycerin (v/v) versetzt und auf eine Phenylsepharose FF aufgetragen. Nach Adsorption wurde das Enzym durch einen Gradienten zwischen 1 M Ammoniumsulfat und 0 M Ammoniumsulfat in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 20 Glycerin zwischen 0,4 M und 0,1 M Ammoniumsulfat eluiert. Nach Ultrafiltration und Umpuffern mit 50 mM Tris-HCl, pH 8 mit 150

mM KCl wurde die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase auf einer Gelfiltrationssäule chromatographiert.

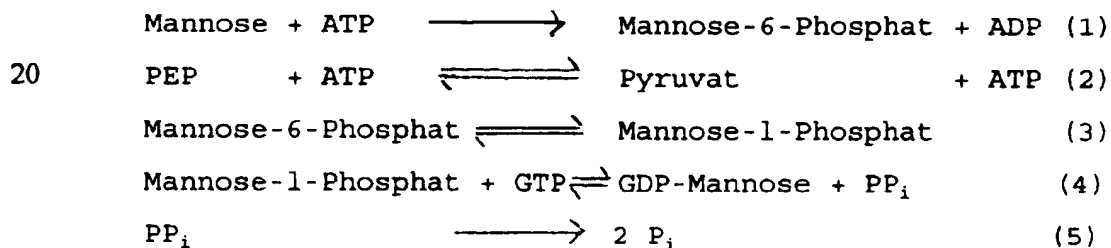
5 Nach Ultrafiltration wurde die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase mit 3 M Ammoniumsulfat versetzt und bei 4°C gelagert.

Die Phosphomannomutase soll über eine Q Sepharose FF partiell gereinigt werden.

10 Sowohl bei der Phosphomannomutase als auch bei der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase handelt es sich um monofunktionelle Enzyme, die spezifisch die für sie beschriebene Reaktion (I und II, siehe oben) katalysieren.

15 Beide Enzyme sollen eingesetzt werden zur enzymatische Synthese von GDP-Mannose, ausgehend von Mannose nach dem folgenden Reaktionschema:

Reaktionsschema 1: (siehe auch Figur 14)



25 Reaktion 1: Hexokinase

Reaktion 2: Pyruvat-Kinase

Reaktion 3: Phosphomannomutase

Reaktion 4: GDP-Mannose-Pyrophosphorylase

Reaktion 5: Pyrophosphatase

30

Reaktion 1 und 2 wurde bereits zur Produktion von Mannose-6-Phosphat von Palanca und Turner, 1993, in J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 3017-3022, eingesetzt.

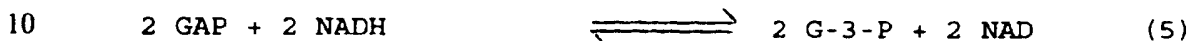
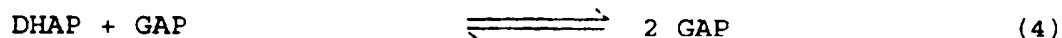
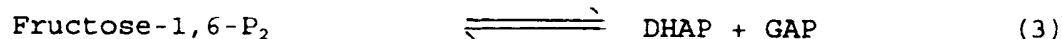
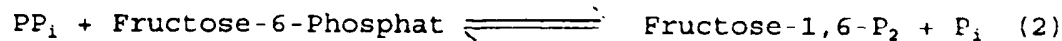
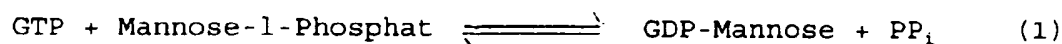
- 5 Die so gebildete GDP-Mannose kann weiter in situ mit Mannosyltransferase zu Oligosacchariden umgesetzt werden.

Die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase-Aktivität wurde nachgewiesen mit einem neu entwickelten kontinuierlichen
10 spektrophotometrischen Test zur Bestimmung von Pyrophosphat (PP_i) produzierenden Nucleotidyltransferasen (EC 2.7) . In der im folgenden beschriebenen Weise kann durch Vorgabe der Substrate (Zucker-1-Phosphate bzw. Zucker im Falle der Neuraminsäure) und Nucleosidtriphosphate) jede beliebige Pyrophosphorylase-Aktivität,
15 die $\geq 0,2$ mU/ml Aktivität im Testgemisch ausmachen kann, bestimmt werden.

Der Enzymtest (Nucleotidyltransferase substrate screening assay 'NUSSA') beruht darauf, daß das bei der
20 Nucleotidyltransferase-Reaktion (EC 2.7-7) entstehende Pyrophosphat mit einer Pyrophosphat-abhängigen Phosphofuctokinase (PP_i PFK aus Pflanzen oder Bakterien EC 2.7.1.90) mit Fructose-6-Phosphat, in Gegenwart von
25 Fructose-2,6-Bisphosphat, zu Fructose-1,6-Bisphosphat umgesetzt wird. Dieses Produkt wird mit einer Aldolase zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerin-3-Phosphat (GAP) gespalten. Aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat entsteht Dihydroxyacetonphosphat durch die
30 Triosephosphatisomerase. Schließlich wird Dihydroxyacetonphosphat durch die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase

zu Glycerin-3-Phosphat (G-3-P) mit NADH reduziert. Pro Mol Pyrophosphat werden 2 Mol NADH verbraucht, was photometrisch verfolgt werden kann.

5 Reaktionsschema 2:



(1) GDP-Mannose-Pyrophosphorylase

(2) Pyrophosphat-abhängige Phosphofructokinase

(3) Aldolase

15 (4) Triosephosphat-Isomerase

(5) Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase

Die nachfolgenden Beispiele zeigen die erfindungsgemäße Arbeitsweise im einzelnen. Dabei wird Bezug genommen

20 auf die angefügten Zeichnungen; es zeigt:

Fig. 1: die Klonierungsstrategie

Fig. 2: den Expressionsvektor pERJ-1

25 Fig. 3: den Expressionsvektor pERJ-2

Fig. 4: die SDS-Gelelektrophorese der exprimierten Genprodukt von pERJ-1 und pERJ-2

Fig. 5: das Chromatogramm der Gelfiltration zur Molekulargewichtsbestimmung

- Fig. 6: die Stabilität der GDP-Man-Pyrophosphorylase bei 4°C
- Fig. 7: die Substratüberschußinhibierung von GTP
- Fig. 8: die Substratüberschußinhibierung von M-1-P
- 5 Fig. 9: die kompetitive Hemmung von GDP-Man bezogen auf GTP
- Fig. 10: die unkompetitive Hemmung von GDP-Man bezogen auf M-1-P
- Fig. 11: den Einfluß des pH-Wertes auf die Synthese von GDP-Mannose
- 10 Fig. 12: die Abhängigkeit der Synthese von GDP-Mannose von der Enzymkonzentration
- Fig. 13: das E * t-Diagramm für die Synthese von GDP-Man ausgehend von Mannose-1-Phosphat und GTP
- 15 Fig. 14: Reaktionsschema der Biosynthese von GDP-Mannose ausgehend von Mannose
- Fig. 15: Synthese von GDP-Mannose ausgehend von 5 mM Mannose
- Fig. 16: Kapillarelektrophorese-Chromatogramm der
- 20 hergestellten GDP-Mannose

Beispiel I

Klonierung der Gene rfb M und rfb K aus dem rfb-Gen-Cluster von *Salmonella enterica*, Gruppe B.

25

Über eine DNA-Datenbank wurden die Gene rfb M und rfb K im rfb-Gen-Cluster identifiziert und die Leseraster bestimmt.

30

rfb M: codiert für die GDP-alpha-D-Mannose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.13)

15

Länge in Bp: 17386 - 18831 : 1445 Basenpaare

Startcodon ATG 17386

Stopcodon TAA TAA TAG 18831

5 Ribosomenbindestelle AAA AGA GAT AA

rfb K codiert für die Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8)

Länge in Bp.: 18812 bis 20245: 1433 Basenpaare

Startcodon: ATG 18812

10 Stopcodon: TAA 20245

Ribosomenbindestelle: GAA GGA GTG GA

Für die in vitro-Amplifikation wurden die folgenden
Oligonucleotidprimer für beide Gene bestimmt.

15

rfb M:

Primer 1: (rfb M1) 5'-CTT GGG TTA CAA ATT AGG CA-3'

Primer 2: (rfb M2) 3'-ATC TTT TAC AAG ACC GCG AG-5'

20

rfb K:

Primer 1: (rfb K1) 5' -CCC CCT GAA GTT AAT TGA GA-3'

Primer 2: (rfb K2) 3' -CCA TTT AAT CCT CAC CCT CT-5'

Die Länge der Gene erhöht sich dabei für rfb M auf 1633
25 Bp. und für rfb K auf 1606 Bp.

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

30

Tabelle 1

PCR-Ansatz zur Klonierung von rfb M und rfb K

	rfb M	rfb K
5		
Vent-Polymerase	1 µl (2U)	1 µl
Vent-Polymerase-Puffer (10x)	10 µl	
H ₂ O	54,4 µl	52,1 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 1,25 mM	16 µl	
10 Primer 1		
rfb M1	6,2 µl (23 pmol/µl)	
rfb K1		6,1 µl (23,6 pmol/µl)
15 Primer 2		
rfb M2	7,4 µl (19,4 pmol/µl)	
rfb K2		9,9 µl (14,5 pmol/µl)
20 genomische DNA aus Salmonella	5 µl	5 µl
(µ 2 µg/100 µl)		
MgCl ₂ (25 mM)	10 µl	10 µl

25

Die Ansätze wurden mit je 70 µl Mineralöl überschichtet, um Verdunstungen zu vermeiden.

Vent-Polymerase-Puffer (BioLabs, New England) (10x)
 200 mM Tris-HCl, pH 8,8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄,
 20 mM MgSO₄, 1% Triton X100 (w/v)

30

Die Laufbedingungen der PCR wurden wie folgt gewählt:

5 min	98°C	
2 min	95°C	6 mal wiederholen
30 sec	49°C	
90 sec	72°C	

35

1 min 95°C
45 sec 49°C 25 mal wiederholen
90 sec 72°C

5

2 min 72°C

Kühlen

10

Nach der PCR wurden die amplifizierten Gene, je 1,6 kB,
nach Lau und Sheu, 1992 in Meth. Mol. Cell. Biol. 3,
190-192, aus einem Agarose-Gel isoliert und je in einen
Hilfsvektor pUCi8 ligiert, der zuvor durch das Restrik-
15 tionsenzym Sma I 'blund ended' linearisiert wurde. Das
Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment betrug ca 1 : 4.
Die Ligation wurde über Nacht bei 14°C durchgeführt.

20

25

30

Tabelle 2

Ansätze zur Ligation der PCR-Produkte in pUC18

			μ l	
5				
	T4-Ligase		1	
	Ligase-Puffer (10x)		6	
	Vektor pUC18/SmaI		1	20-60 μ g/Ansatz
10	H ₂ O (steril)	rfb M	12	
		rfb K	18	
	DNA-Fragment	rfb M	10	80-240 μ g/Ansatz
		rfb K	4	
15	Ligase-Puffer (10x): 0,5 M Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 500 μ g/ml BSA			
20	Dieser Vektor mit dem inserierten Gen wurde in kompetente Zellen von Escherichia coli DH5alpha (nach Hanahan, 1983 in J. Mol. Biol. 166, 557-580) transformiert. Dazu wurde 5 μ l der Ligationsansätze und 15 μ l steriles H ₂ O mit je 200 μ l auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen versetzt und 30 Min auf Eis inkubiert.			
25	Die Ansätze wurden dann für 40 sec auf 42°C erhitzt und wieder für 2 min auf Eis gestellt. Zu den Ansätzen wurden dann 800 μ l SOC-Medium (gegeben und diese dann 1 Stunde bei 37°C inkubiert und schließlich auf LB _{Amp-100} -Agar-Platten ausgestrichen, die mit X-Gal beschichtet waren.			
30				

5 SOC-Medium: pH 7, 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g
NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM
(sterilfiltrierte) Glucose, H₂O ad
1000 ml

^{Lb}amp-100: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl
(und 15 g Bacto-Agar)
Ampicillin 100 mg/Liter

10

X-Gal: 5-Brom-4-Chlor-indoyl- β -D-Galactose
(40 mg/ml) 70 μ l pro Agar-Platte

15 Aus den positiven farblosen Kolonien wurde das Plasmid
pUC18/rfb M bzw. rfb K isoliert (nach Birnboim und Do-
ly, 1979).

pUC18/rfb M wurde mit den Restriktionsenzymen EcoR I
und BamH I linearisiert und das Gen rfb M aus dem Vek-
tor heraus-geschnitten. Aus einem Agarose-Gel wurden
20 die Gene rfb M und rfb K isoliert und in den Expressi-
onsvektor (pT7-6) ligiert.

25

30

Tabelle 3

Ansätze zur Ligation der Gene rfb M und rfb K in pT7-6
 μ l

5

T4-Ligase	1	(0,1 Weiss-Unit)
T4-Ligase-Puffer (10x)	6	(siehe oben)
Vektor pT7-6/Eco RI-BamH I	2	
H ₂ O steril	rfb M	13
	rfb K	17
DNA	rfb M	8
	rfb K	3

10

15

Diese Ligationsansätze (pT7-6/rfb M und pT7-6/rfb K) wurden in kompetente Zellen (nach Cohen, Shng und Hsu, 1972 in Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 69 (8), 2110-2114) von im Falle von rfb M Escherichia coli BL21(DE3)pLysS der Firma Novagen und im Falle von rfb K in Escherichia coli BL21(DE3) transformiert.

20

Der Stamm, der das in pT7-6 inserierte Gen rfb M enthält wird im folgenden E. coli BL21(DE3)pLysSpERJ-1 genannt. Der Stamm, der das in pT7-6 inserierte Gen rfbk enthält, wird im folgenden E. coli BL21(DE3)pERJ-2 genannt.

25

Die Expression der Gene rfb M und rfb K wurde wie folgt durchgeführt:

30

Es wurden aus Vorkulturen von Escherichia coli BL21(DE3) pLysSpERJ-1 (5 ml LB_{Amp}-Chloramp-50 (Ampicillin

und Chloramphenicol je 50 mg/Liter) über Nacht bei 120 rpm und 37°C) Hauptkulturen (10 ml) 2%-ig angeimpft und in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37°C und 120 rpm auf einem Schüttler solange angezogen bis eine optische Dichte, bei 546 nm, von 0,5 erreicht wurde. Ein Milliliter der Kultur wurde entnommen, abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 50 µl Probenpuffer (SDS und β-mercaptoethanol-haltig) versetzt. Diese Probe wurde 3 min bei 95°C erhitzt und nach Abkühlen auf ein SDS-Polyacrylamidgel (Methode siehe unten) aufgegeben. Der Rest der Kultur wurde mit 0,4 mM IPTG versetzt, 20 min inkubiert, worauf wieder 1 Milliliter entnommen und wie oben behandelt wurde. Der Rest der Kultur wurde mit 0,03 mM Rifampicin versetzt und 60 min inkubiert. Es wurde 1 Milliliter entnommen und wie oben beschrieben behandelt. Von diesen Proben wurden jeweils 10 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Escherichia coli BL21(DE3)pERJ-2 wurde wie oben beschrieben angezogen.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach (Laemmli, 1970, in Nature 227, 680-685) durchgeführt. Ein Foto des Coomassie-Brilliant-Blue gefärbten Gels zeigt Figur 4.

Isolierung der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase aus Escherichia coli BL21

Anzucht von E.coli BL21 und Aufschluß der Zellen:
bei 37°C in einem Schüttler bei 120 rpm

Ausgehend von einer Vorkultur (Über Nacht-Inkubation, 200 ml in einem 1000 ml Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen) wurden je 2 Liter LB_{Amp-Chloramp-50} in fünf 5-Liter-Kolben mit Schikanen 1%ig angeimpft und die Kulturen bis zu einer optischen Dichte von 0,8 angezogen (3.5 Stunden). Nach 20minütiger Inkubation mit 0,4 mM IPTG und 60minütiger Inkubation mit 0,03 mM Rifampicin wurden die Kulturen abzentrifugiert (Sorvall GS3, 8000 rpm, 10 min, 20°C) und mit 50 mM Tris-HCl, pH 8 zweimal gewaschen. Anschließend wurde das Feuchtgewicht bestimmt (ca. 25 g) und eine 20%ige (w/v) Zellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden anschließend in einem Disintegrator S durch Naßvermahlung aufgeschlossen. Dazu wurden 40 g Zellsuspension mit 80 g Glasperlen (0,3 mm Durchmesser) gemischt und innerhalb von 12 min bei 4000 Upm homogenisiert. Die Zelltrümmer und die Glasperlen wurden durch 15minütige Zentrifugation (Sorvall GSA, 10000 rpm, 20°C) abgetrennt, einmal in 50 mM Tris-HCl, pH 8 gewaschen und wieder zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und bildeten den Rohextrakt für die Anionenaustauschchromatographie an Q-Sephrose FF.

25

Q-Sephrose FF:

400 ml Q-Sephrose FF wurden mit 226 ml Rohextrakt (mit 11,1 mg/ml Protein) beladen. Die Stufenelution startet mit ca. 800 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8 und ca 1400 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8, mit 150 mM KCl. Das Enzym wird

30

mit ca 900 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8 mit 400 mM KCl eluiert. Diese Fraktion wird mit 1 M Ammoniumsulfat und 20% Glycerin versetzt und auf eine Phenyl-sepharose FF (66 ml) geladen. Das Enzym wird mit einem linearen auf
5 0 M Ammoniumsulfat abfallenden Gradienten von 50 mM Tris-HCl, pH 8 mit 20% Glycerin (Gesamtvolumen 1000 ml) eluiert. Die aktivsten Fraktionen, zwischen 0,4 M und 0,1 M Ammoniumsulfatkonzentration wurden vereinigt, nach Ultrafiltration umgepuffert (50 mM Tris-HCl, pH 8,
10 150 mM KCl) und abschließend in einer Gelfiltrationsäule (Superdex G-75) chromatographiert (siehe im folgenden Tabelle 4).

Die rekombinante GDP-Mannose-Pyrophosphorylase wurde aus E. coli 6,3-fach angereichert. Bei einer Ausbeute
15 von 13,5 % konnte eine spezifische Aktivität von 2,34 U/mg erreicht werden. Ausgehend von 0,37 U/mg konnte über die Q-Sepharose ein Reinigungsfaktor von 2 bei einer Ausbeute von 85% erreicht werden. Die nachfolgende hydrophobe Interaktionschromatographie an
20 Phenylsepharose führte durch das Vereinigen nur der aktivsten Fraktionen zu einem relativ hohen Verlust von 40%, bei einer Steigerung der spezifischen Aktivität auf 2,27 U/mg.

25 Das Molekulargewicht der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase beträgt unter denaturierenden Bedingungen (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) 54 kD. Zur Molekulargewichtsbestimmung im nativen Zustand wurde, mit 2 ml (7,54 mg/ml) Enzymprobe aus der Aufreinigung siehe
30 oben, eine Gelfiltration an Sephadex G-200 (115,5 ml) durchgeführt. Die Aktivitätsbestimmung wurde mit dem

nachfolgend beschriebenen erfindungsgemäßen Enzymtest für Pyrophosphorylasen durchgeführt. 2 Aktivitätsmaxima konnten bestimmt werden, die den Molekulargewichten 208700 Dalton und 107800 Dalton entsprechen. Im nativen Zustand liegt das Enzym daher als Dimer bzw. Tetramer vor.

Tabelle 4

Reinigung der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase; Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte

Probe	Gesamt-protein [mg]	Gesamt-aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungs-faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	2504	918,1	0,37	1,0	100
Q-Sepharose FF	981	782,3	0,79	2,1	85,2
HIC (Phenylseph.)	153	347,2	2,27	6,1	37,8
UF (HIC)	126	270,0	2,14	5,8	29,4
C-75 UF (Gelfiltration)	53	123,7	2,34	6,3	13,5

Folgende Untersuchungen zur Wirkungsweise und Anwendung der GDP-alpha-D-Mannose-Pyrophosphorylase wurden durchgeführt:

1) Untersuchungen zur Stabilität

Das Enzym wurde bei 4°C auf seine Lagerstabilität untersucht. Dazu wurde eine Enzympräparation mit

1,15 U/mg ohne Stabilisator sowie mit 0,1 mg/ml BSA, bzw. 3 M Ammoniumsulfat, bzw. 25% Glycerin versetzt und über 47 Tage bei 4°C inkubiert. Nach 47 Tagen konnte in den Ansätzen ohne Stabilisator und mit BSA eine Restaktivität von ca 5% gefunden werden, während die Ansätze mit Glycerin und Ammoniumsulfat noch Aktivitäten von 75% bzw. 65% aufwiesen. In dem Ansatz mit Ammoniumsulfat konnte noch nach 4 Monaten eine Aktivität von 50% der Ausgangsaktivität festgestellt werden (Figur 6).

Weiter wurde die Stabilität bei 30°C untersucht, indem eine definierte Stammlösung an Enzym mit 79,3 mU/mg bei 30°C in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 5mM MgCl₂ inkubiert und nach verschiedenen Zeiten (0 h, 2 h, 6 h und 30 h) eine Aktivitätsbestimmung durchgeführt wurde.

Tabelle 4a

Temperaturstabilität der GDP-Man-Pyrophosphorylase bei 30°C

Stunden [h]	Aktivität (mU/mgl	Relative Aktivität [%]
0	79,3	100
2	78,4	98,9
6	67,8	85,6
30	53,7	67,7

Aktivitätsbestimmung per NUSSA mit 2 mM GTP und 0,08 mM M-1-P

- 2) Bestimmung der k_m - und v_{max} -Werte für die Substrate GTP und Mannose-1-Phosphat (M-1-P).

Bedingungen: 2,27 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ GDP-Mannose-Pyrophosphorylase-Präparation nach der Gelfiltration, Aktivitätsbestimmung per NUSSA.

- a) Bestimmung des k_m -Wertes und des v_{max} -Wertes für GTP Mannose-1-Phosphat wurde mit konstant 0,08 mM eingesetzt. GTP wurde zwischen 0,01 mM und 10 mM eingesetzt (Figur 7)

- b) Bestimmung des k_m -Wertes und des v_{max} -Wertes für M-1-P GTP wurde mit konstant 2 mM eingesetzt. Mannose-1-Phosphat wurde zwischen 0,002 mM und 0,6 mM variiert (Figur 8)

Tabelle 5

Kinetische Konstanten für die Substrate GTP und M-1-P der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase

	GTP	M-1-P
k_m -Wert	0,2 mM	0,01 mM
v_{max} -Wert	2,4 U/mg	1,8 U/mg
K_i -Wert (Substratüberschuß)	10,9 mM	0,7 mM

3) Einfluß von GDP-Mannose auf die Synthese

Bedingungen: 2,27 $\mu\text{g/ml}$ [in a)] und 5,67 $\mu\text{g/ml}$ [in b)]

GDP-Mannose-Pyrophosphorylase-Präparation

5 nach Gelfiltration

Aktivitätsbestimmung per NUSSA

a) Mannose-1-Phosphat wurde mit 0,08 mM konstant eingesetzt.

10 GTP wurde variiert zwischen 0,08 mM und 6 mM.

GDP-Mannose wurde mit 0 μM , 50 μM und 100 μM im

Test eingesetzt.

Die Auswertung der gemessenen Aktivitäten zeigt eine kompetitive Hemmung von GDP-Mannose bezogen auf

15 GTP (Figur 9). Der K_i -Wert wurde berechnet zu

14,9 μM .

b) GTP wurde konstant mit 2 mM im Test eingesetzt.

20 Mannose-1-Phosphat wurde variiert zwischen 0,003 mM und 0,3 mM.

Die Auswertung der gemessenen Aktivitäten zeigt eine

unkompetitive Hemmung von GDP-Mannose bezogen

auf M-1-P (Figur 10). Der K_i -Wert wurde berechnet

zu 118 μM .

25

4) Substratspektrum der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase

Bedingungen: Die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase wurde mit 7,3 mU/mg im Enzymtest NUSSA eingesetzt.

5 a) Nucleosidtriphosphate: ATP, CTP, GTP, UTP, dTTP je
1 mM Zucker-1-Phosphate: Mannose-1-Phosphat mit
2,5 mM.

b) Nucleosidtriphosphat : GTP
10 Zucker-1-Phosphate. : Glucose-1-P, N-Acetylglucosamin-1-P, Glucosamin-1-P, Galactose-1-P, Galactosamin-1-P, N-Acetylgalactosamin-1-P,
Glucuronsäure-1-P, Galacturonsäure-1-P, Xylose-1-P,
Mannose-1-P

15

Sowohl in a) als auch in b) konnte außer mit den natürlichen Substraten GTP und Mannose-1-Phosphat kein Umsatz festgestellt werden.

20

5) Anwendung der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase zur
Synthese von GDP-Mannose

25 Die Synthese sollte ausgehend von Mannose nach Reaktionsschema 1 durchgeführt werden.

Zunächst wurde die Synthese von GDP-Mannose ausgehend von Mannose-1-Phosphat und GTP untersucht. Hierzu wurde die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase gekoppelt mit der Pyrophosphatase eingesetzt (1 U/ml).

30

Die Synthese wurde bei verschiedenen pH-Werten (7, 8, 9) in 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ mit 2 mM GTP und 2 mM Mannose-1-Phosphat in einem Gesamtvolumen von 2 ml bei Raumtemperatur durchgeführt. Die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase wurde mit 0,04 U/ml eingesetzt, die Pyrophosphatase mit 1 U/ml. Nach verschiedenen Zeiten wurden dem Ansatz 200 µl entnommen und 5 min bei 95°C erhitzt, abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 10000 rpm, 2 min, Raumtemperatur) und über die Kapillarelektrophorese analysiert.

Über Eichkurven und den Vergleich der Flächen konnte der Gehalt an GTP und GDP-Mannose bestimmt werden. Die Umsetzungen zeigen eine höhere Ausbeute an GDP-Mannose bei alkalischen pH-Werten (Figur 11). Da die anderen Hilfsenzyme (Reaktionsschema 1: Hexokinase und Pyruvat-Kinase) pH-Optima zwischen pH 7 und pH 9 aufweisen (Boehringer-Mannheim, 1987 in Biochemica-Information) wurde für die weiteren Synthesen ein pH-Wert von 8 gewählt.

Untersucht wurde im folgenden die Abhängigkeit der Synthese von GDP-Mannose von der Enzymkonzentration an GDP-Mannose-Pyrophosphorylase, die mit 0,04 U/ml, 0,06 U/ml, 0,08 U/ml, 0,1 U/ml und 0,2 U/ml eingesetzt wurde. Die Umsetzungen zeigen eine erhöhte Ausbeute an GDP-Mannose bei gleichbleibender Inkubationszeit und Erhöhung der Enzymkonzentration (Figur 12). Die Multiplikation der Enzymkonzentration mit der Inkubationszeit führt zu einer Reaktionskonstanten ($E \cdot t$). Bei Variation der Enzymkonzentration bzw. der Inkubationszeit können unter Konstanthaltung des $E \cdot t$ -Produktes konstante Ausbeuten erzielt werden. Bei einem

30

E * t von 20 (U*min/ml) ist das Reaktionsgleichgewicht unter den gewählten Bedingungen eingestellt und eine Ausbeute an GDP-Mannose von ca. 90 % erreicht (Figur 13).

5

Beispiel II

Nucleotidyltransferase substrate screening assay

(NUSSA)

10

Reaktionsschema 2

(1)	NTP + Zucker-1-Phosphat	NDP-Zucker + PP _i
(2)	PP _i + Fructose-6-Phosphat	Fructose-1,6-P ₂ + P _i
(3)	Fructose-1,6-Pi	DHAP + GAP
(4)	DHAP + GAP	2 D HAP
(5)	2 DHA.P + 2 NADH + H ⁺	2 G-3-P + NAD ⁺

15

20

(1) Pyrophosphorylase, (2) pyrophosphatabhängige Phosphofructokinase, (3) Aldolase, (4) Triosephosphat- Isomerase, (5) Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
 NTP: Nucleosidtriphosphat / NDP: Nucleosiddiphosphat / DHAP: Dihydroxyacetonphosphat / GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat / G-3-P: Glycerin-3-Phosphat / NAD: Nicotinsäuramidadenosindiphosphat, reduzierte Form

25

30

O'Brien, Bowien und Wood beschrieben 1975 in J. Biol. Chem. 250 (22), 8690-8695 einen gekoppelten photometrischen Enzymtest zur Messung von einer pyrophosphat-abhängigen Phosphofructokinase (PP_iPFK), wie sie erstmalig von Reeves et al., 1974 in J. Biol. Chem. 249, 7737-7741, in Entamoeba histolytica entdeckt wurde. Hierbei wurde die PP_iPFK gekoppelt mit der Reaktion der Aldolase (Reaktion 3), der Triosephosphatisomerase (Reaktion 4) und der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase

(Reaktion 5). Die Reaktion wurde photometrisch bei 340 nm verfolgt.

Der folgende Enzymtest (NUSSA) koppelt erfindungsgemäß die Reaktion der Nucleotidyltransferase mit diesem Testsystem und ermöglicht somit die Messung einer beliebigen Pyrophosphorylase bzw. eines beliebigen Pyrophosphat-freisetzenden Enzyms. Der Test NUSSA wurde optimiert auf die Messung in Microtiterplatten in 200 µl Gesamtvolumen.

Tabelle 6

Zusammensetzung des Enzymtests NUSSA

	Endkonzentration	PP _i PFK-Test	Pyrophosphorylase-Test
Tris-HCl, pH 8	50 mM		
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	5 mM	128 µl	108 µl ± x µl
NADH	0,15 mM	10 µl	10 µl
Fructose-6-Phosphat	2,5 mM	10 µl	10 µl
Fructose-2,6-P ₂	1 µM	10 µl	10 µl
PP _i	2,5 mM	10 µl	---
Zucker-1-Phosphat	variabel	---	10 µl
Nukleosidtriphosphat	variabel	---	10 µl
PP _i PFK-Präparation	variabel	20 µl	10 µl ± x µl
Aldolase	0,09 U/200 µl	4 µl	4 µl
Triosephosphat-Isomerase	1 U/200 µl	4 µl	4 µl
Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase	0,136 U/200 µl	4 µl	4 µl
Pyrophosphorylase-Präparation	variabel	---	20 µl

Das Gesamtvolumen betrug 200 µl. Die Ansätze wurden in einem Titertek-Photometer Molecular Devices, München) photometrisch vermessen. In Falle des PP_iPFK-Tests wurde mit PP_i gestartet, im Falle der Pyrophosphorylasen

wahlweise mit dem Zuckerl-Phosphat oder dem Nucleosid-triphosphat.

Zur Berechnung der Aktivität wurde folgende Formel angewendet:

5

10

15

$$\begin{aligned}
 & \Delta E \text{ (mOD/Zeit)} \cdot \text{Probenverd\u00fcnnung} \cdot \text{Me\u00dfvolumen} \\
 U/ml &= \frac{1000 \cdot \text{Probenvolumen} \cdot d \cdot \epsilon_{\text{mODN}} \cdot 2}{10^{-3} \Delta E/\text{min} \cdot \text{Probenverd\u00fcnnung} \cdot 200 \mu l} \\
 &= \frac{10^3 \cdot 20 \mu l \cdot 0,67 \text{ cm} \cdot 6,3 (1 \cdot \text{mmol l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot 2}{\Delta E \cdot \text{Probenverd\u00fcnnung} \cdot 0,0012 \mu \text{mol/ml} \cdot \text{min}}
 \end{aligned}$$

Anwendung des Enzymtests NUSSA

20

1) Beispiel siehe oben: Aktivitätsmessungen der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase

25

2) Beispiel : Anwendung des NUSSA zum Screening auf Pyrophosphidhorylasen in zwei verschiedenen Enzymquellen:

- a) Escherichia coli BL21(DE3)pLysSpERJ-1
- b) Reis (Oryza sativa L.)

30

Zur Anwendung des Tests mu\u00df die PP_iPFK aufgereinigt werden. Als einfache und gut verf\u00fcgbare Enzymquelle wurde die Kartoffel (Solanum tuberosum L.) gew\u00e4hlt. Die

Aufreinigung wurde nach der von van Schaftingen et al., 1982 in Eur. J. Biochem. 129, 191-195 beschriebenen Methode durchgeführt. Das Enzym (PP_i PFK) wurde in 25% Glycerin bei -20°C aufbewahrt.

5

Escherichia coli BL21(DE3)pLysSpERJ-1 wurde, wie oben beschrieben, angezogen und aufgeschlossen. Das erhaltene Rohhomogenat wurde bei 10000 rpm, 2 min, 20°C abzentrifugiert und im Enzymtest eingesetzt (21.02 mg/ml).

10

Der Reis wurde nach Elling, 1993 in Patent DE 42 21 595 C1, aufgeschlossen, bei 10000 rpm, 10 min, 20°C abzentrifugiert und als Rohextrakt (4.26 mg/ml) im Enzymscreening eingesetzt. Als Substrate wurden getestet:

15

a) Nucleosidtriphosphate: ATP, CTP, GTP, UTP, dTTP je 1 mM im Test mit Glucose-1-Phosphat (2.5 mM)

b) Nucleosidtriphosphat UTP (1 mM)
Zucker-1-Phosphate je 2,5 mM im Test

20

Die Tabelle 7 zeigt die spezifischen Aktivitäten von Pyrophosphorylasen in einer mikrobiellen und einer eukaryotischen Enzymquelle.

25

30

Tabelle 7

Spezifische Aktivitäten von Pyrophosphorylasen
in E.coli und Reis

5	α -D-Zucker-1-Phosphate [2,5 mM]	NTPs [1 mM]	E. coli [mU/mg]	Reis [mU/mg]
10	α -D-Glucose-1-Phosphat	+ ATP	2,76	-
		+ CTP	0,75	-
		+ GTP	-	-
		+ UTP	214,10	982,40
		+ dTTP	10,32	5,98
15	α -D-Glucosamin-1-P	+ UTP	2,75	-
	α -D-GlcNAc-1	+ UTP	2,02	0,27
	α -D-Galactose-1-P	+ UTP	1	10,41
	α -D-Galactosamin-1-P	+ UTP	-	0,25
	α -D-GalNAc-1-P	+ UTP	-	0,18
20	α -D-Glucuronsäure-1-P	+ UTP	4,72	14,27
	α -D-Galacururonsäure-1-P	+ UTP	3,66	2,94
	α -D-Xylose-1-P	+ UTP	-	0,42
	α -D-Manose-1-P	+ GTP	3,41	1,51
25	20 µg/ml E. coli BL21(DE3)pLysS-pJER-1-Rohextrakt im Testansatz, 1,06 µg/ml bis 0,14 mg/ml Oryza sativa-Rohextrakt im Testansatz. Aktivitätsbestimmung per NUSSA			

Zur Analytik der Synthese der GDP-Mannose wurde eine Kapillarelektrophorese (Gerät: Firma Beckman) angewendet. Als Methode wurde die Kapillarzonen-elektrophorese mit einem Boratpuffer-System eingesetzt. Hierzu wurden 40 ml 0,4 mM Borsäure und 20 ml 0,1 mM Natriumborat gemischt und mit 140 ml H₂O aufgefüllt. In diesem Verhältnis gemischt stellt sich ein pH-Wert von ca. 8,3 ein. Die Stromspannung wurde mit 25 kV vorgewählt. Die Stromstärke stellte sich ein auf ca. 35-7 µA.

Um die Konzentrationen aus den Elektropherogrammen bestimmen zu können, wurden von GDP-Mannose und GTP ver-

5 verschiedene Konzentrationen zwischen 0,02 mM und 0,4 mM
in 50 mM Tris-HCl, pH 8 mit 5 mM MgCl₂ angesetzt und
über die Kapillarelektrophorese analysiert. Aus der
Auftragung der Fläche gegen die theoretisch eingesetzte
Konzentration (mM) resultiert eine Gerade, so daß eine
lineare Regression durchgeführt werden konnte:

GTP $y = b * x + a$ mit a: 0.0534
b: 3.5314
10 r: 0.991
Fehlerquadratsumme: $0.4024 * 10^{-2}$

GDP-Mannose: $y = b * x + a$ mit a: 0.0552
b: 3.4742
15 r: 0.994
Fehlerquadratsumme: $0.7178 * 10^{-3}$

Isolierung der Phosphomannomutase aus E. coli BL21(DE3)

20 Anzucht von E. coli BL21 und Aufschluß der Zellen:
bei 37°C in einem Schüttler bei 120 rpm wie bei der
GDP-Mannose-Pyrophosphorylase.

25 Der gewonnene Rohextrakt wurde auf einen Anionenaustau-
scher gegeben:

Q-Sepharose FF:

77 ml Q-Sepharose FF wurden mit 122 ml Rohextrakt (mit
14 mg/ml Proteingehalt) beladen. Es wurde ein linear
ansteigender Gradient (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0-600 mM
30 KCl) angelegt und das Protein zwischen 280 und 460 mM
KCl eluiert. Die aktiven Fraktionen wurde vereinigt und

das Protein mit 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ präzipitiert. Nach Zentrifugation (15 min, 10000 rpm, 4 OC) wurde das Pellet in 5 ml Tris-HCl, pH 8 aufgenommen. Das Enzym konnte mit einem Reinigungsfaktor von 2.4 und einer Ausbeute von 78 % gewonnen werden.

Tabelle 8

Partielle Reinigung der Phosphomannomutase

	Gesamt-protein [mg]	Gesamt-Aktivität [U]	spezifische Aktivität [U/mg]	Volumen [ml]	Reinigungs-faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	1703,1	187,9	0,11	112	1	100
Q-Sepharose	554,2	146,5	0,26	240	2,4	78

Enzymatische Synthese von GDP- α -D-Mannose ausgehend von Mannose

Die enzymatische Synthese von GDP-Mannose (Figur 14) verläuft ausgehend von Mannose über die Hexokinase-katalysierte Phosphorylierung an C6, die Isomerisierung von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat durch die Phosphomannomutase und die Umsetzung von Mannose-1-Phosphat mit GTP zu GDP-Mannose durch die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase.

Das eingesetzte ATP wird rezykliert, indem das bei der Hexokinasereaktion entstehende ADP mit Phosphoenolpyruvat unter der Katalyse durch die Pyruvat-Kinase zu ATP

und Pyruvat umgewandelt wird (Wong et al., 1995 in Angew. Chem. 107, 569-593) (Figur 15).

Die Synthese in größerem Maßstab wurde im 'repetitive batch'-Verfahren durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Syntheseansatzes betrug 80 ml. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Syntheseansatzes:

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
10 GTP	253 mg	5 mM
Mannose	72,1 mg	5 mM
PEP	125 mg	7,5 mM
ATP	88,2 mg	2 mM
Glc-1,6-P ₂	1 mg	0,25 mM
Hexokinase		1 U/ml
15 Pyruvat-Kinase		40 U/ml
PMM		1 U/ml
GDPM-PP		1 U/ml
PPase		2 U/ml
Tris-HCl, pH 8		50 mM
20 MgCl ₂		10 mM
KCl		10 mM

PMM: Phosphomannomutase; PPase: Pyrophosphatase; GDPM-PP: GDP- α -D-Mannose-Pyrophosphorylase

Nach 24 Stunden wurde der Ansatz über ein Ultrafiltrationsmodul mit einer YM 10-Membran (cut off von 10 kD) der Firma Amicon (Witten) auf 5 ml eingeeengt und mit 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂ auf 50 ml aufgefüllt, wieder eingeeengt und erneut aufgefüllt und auf 5 ml eingeeengt. Das proteinhaltige Retentat wurde für einen erneuten Syntheseansatz mit Substratlösung (75 ml) versetzt und erneut 24 Stunden inkubiert. Diese Vorgehensweise wurde noch ein weiteres Mal wiederholt.

Die Filtrate wurden mit alkalischer Phosphatase (1 U/ml) versetzt und 24 Stunden inkubiert, um Nucleosidmono-, di- und triphosphate bzw. Zucker-Phosphate wie Mannose-6- oder 1-Phosphat zu dephosphorylieren. Der aktivierte Zucker wird von der Phosphatase nicht angegriffen.

Insgesamt wurden dreimal 253 mg (0,4 mmol) GTP mit 216,3 mg Mannose umgesetzt. Die Überprüfung der Ausbeuten nach je 24 Stunden ergab:

			Ausbeute
15	Ansatz 1:	4,4 mM GDP-Mannose:	88%
	Ansatz 2:	4,8 mM GDP-Mannose:	96%
	Ansatz 3:	2,8 mM GDP-Mannose:	56%

Mittlere Ausbeute in 72 Stunden: 80 %

Dies entspricht 581 mg GDP-Mannose, bezogen auf die freie Säure (605,3 g/mol).

Nach der Inkubation mit alkalischer Phosphatase wurden die Ansätze ultrafiltriert und vereinigt und auf einen Anionenaustausche Dowex^R 1x2 Cl⁻, Serva) gegeben.

Die GDP-Mannose wurde nach einem linearen Gradienten zwischen 0 und 0,5 M LiCl (500 ml) mit 1 M LiCl eluiert. Die GDP-Mannose enthaltende Lösung (900 ml mit 0,92 mM GDP-Mannose) wurde über einen Rotationsverdampfer eingedunstet. Diese Fraktion wurde über Sephadex G-10 gefiltriert und anschließend die GDP-Mannose enthal-

- tenden Fraktionen lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in wenig Wasser gelöst und mit eiskaltem Aceton versetzt. Die ausfallende GDP-Mannose wurde abfiltriert, in Wasser aufgenommen, lyophilisiert und über die Kapillarelektrophorese durch Vergleich der Fläche mit einer Eichkurve analysiert. Figur 16 zeigt das Elektropherogramm der unverdünnten Probe (1 mg des Lyophilisats/ml Wasser).
- 10 Insgesamt konnten 199 mg GDP-Mannose in 500 mg Lyophilisat erhalten werden.

15

Patentansprüche

1. Mannose- bzw. mannosederivat-spezifische, aus Mikroorganismen isolierbare GDP-Mannose-Pyrophosphorylase (GDP-Man-PP) mit einer spezifischen Aktivität ≥ 2 U/mg.
5
2. GDP-Mannose-Pyrophosphorylase nach Anspruch 1, bakteriellen Ursprungs.
3. Verfahren zur Gewinnung von GDP-Man-PP,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man einen im Hinblick auf die Bildung von GDP-Man-PP rekombinanten Stamm von auf Enzymproduktion ausgelegten Mikroorganismen in angepaßtem Medium kultiviert; die geernteten Zellen aufschließt und
15 den durch Zentrifugieren erhaltenen Rohextrakt auf einen Anionenaustauscher gibt, der einer Stufen-Gradienten-Elution unterworfen wird, aus deren enzymangereicherter Fraktion die GDP-Man-PP durch
"Hydrophobe Interaktions-Chromatographie" (HIC) mit
20 linear abfallendem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten gewonnen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
25 daß man einen durch Inserierung des für die GDP-Man-PP kodierenden Gens rfb M in ein Plasmid und Ein-

schleusung desselben in einen geeigneten Produzenten-Stamm erhaltenen rekombinanten Stamm verwendet.

5. Verfahren zur Herstellung von GDP-Mannose,
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 daß man Mannose-1-Phosphat enzymatisch in Gegenwart
 von GDP-Man-PP nach Anspruch 1 mit GTP umgesetzt.
6. Verfahren nach Anspruch 5,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 daß das Mannose-1-Phosphat durch Umwandlung von Mannose-6-Phosphat mit Hilfe von Phosphomannomutase gebildet wird.
- 15 7. Zur Umwandlung von Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat befähigte Phosphomannomutase mikrobiellen Ursprungs.
8. Phosphomannomutase nach Anspruch 7,
20 erhalten aus einem durch Inserierung des für die Phosphomannomutase kodierenden Gens rfb K in ein Plasmid und Einschleusung desselben in einen geeigneten Produzenten-Stamm erhaltenen rekombinanten Stamm, insbesondere Bakterienstamm.
- 25 9. Photometrischer Nucleotidyltransferase-Test NUSSA mit fünfstufiger Umsetzung gemäß Reaktionsschema 2 von Seite 8, bei dem NADH photometrisch ermittelt und gemäß der Beziehung 2 Mol NADH Verbrauch entsprechen 1 Mol umgesetztes NTP umgerechnet wird.
- 30

1/10

Strategie der Rfb-Proteinüberexpression

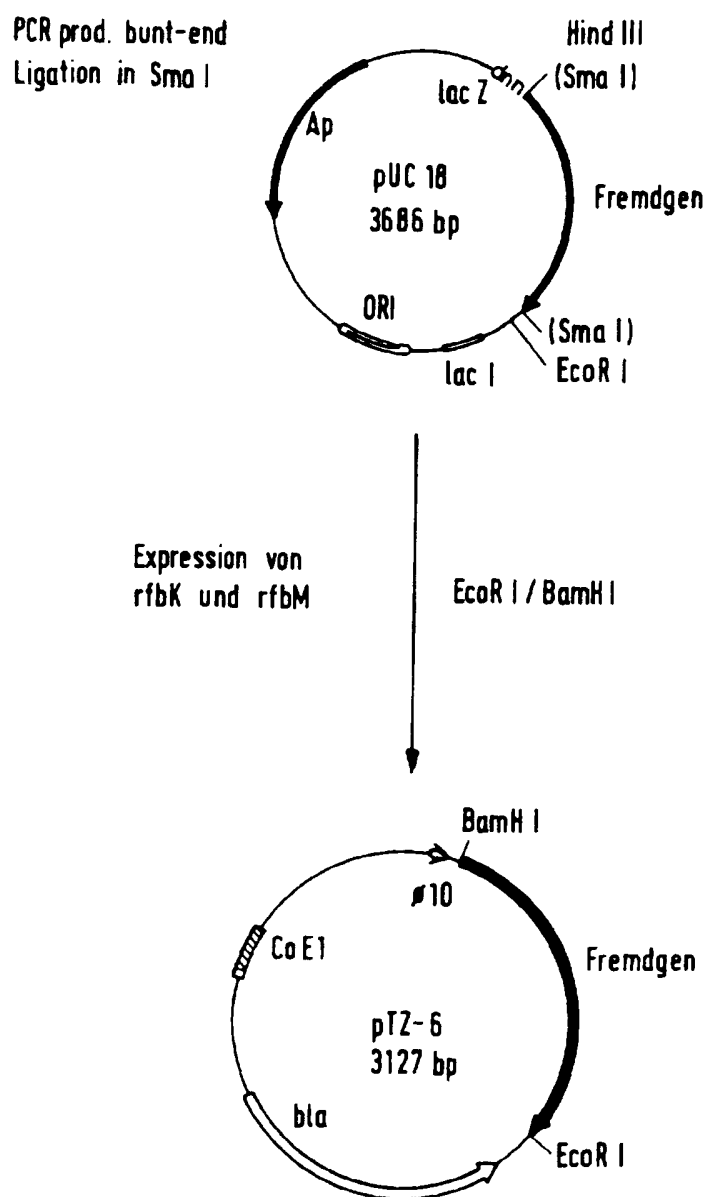


FIG. 1

2/10

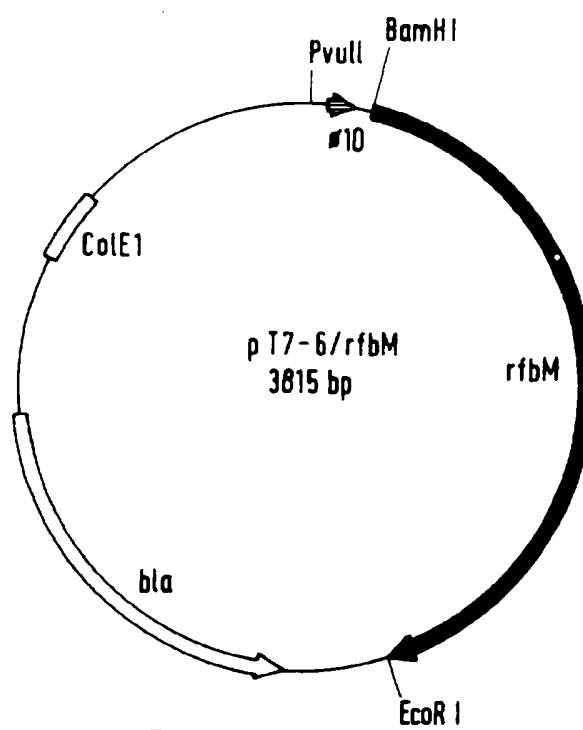


FIG. 2

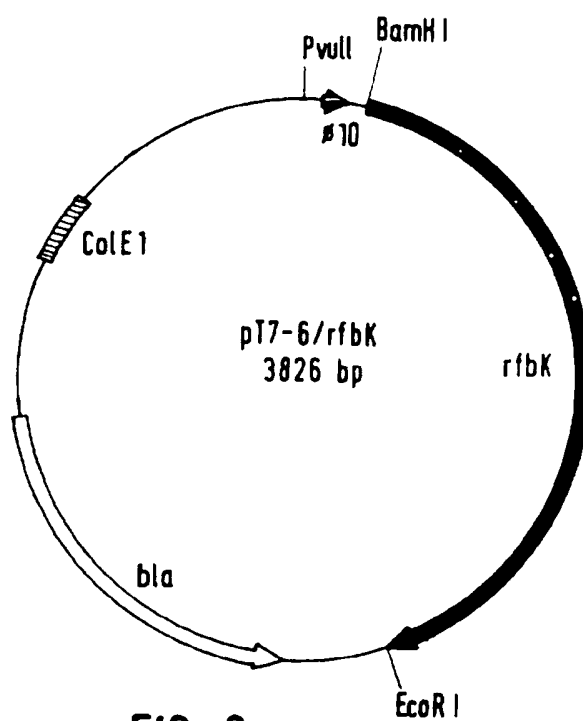


FIG. 3

3/10

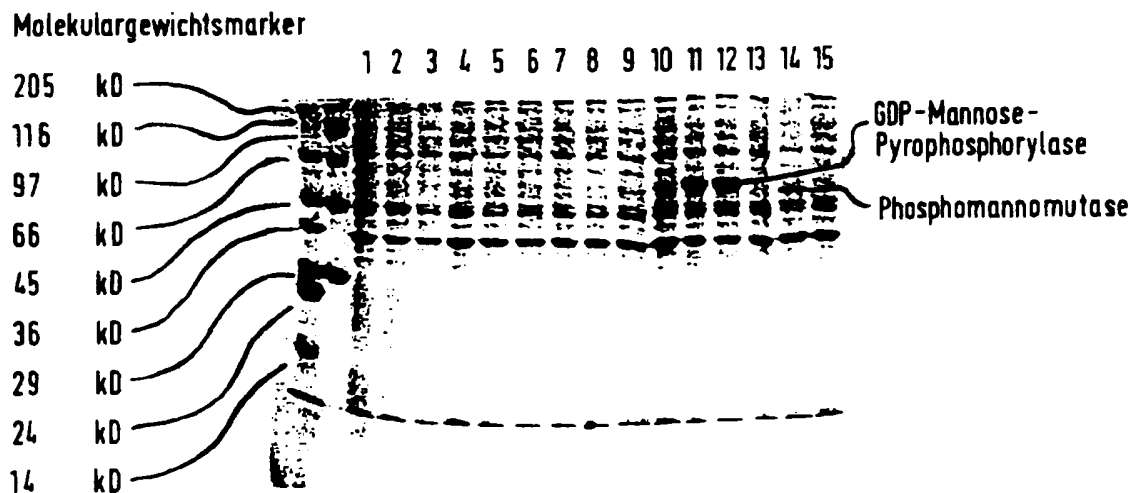


FIG. 4

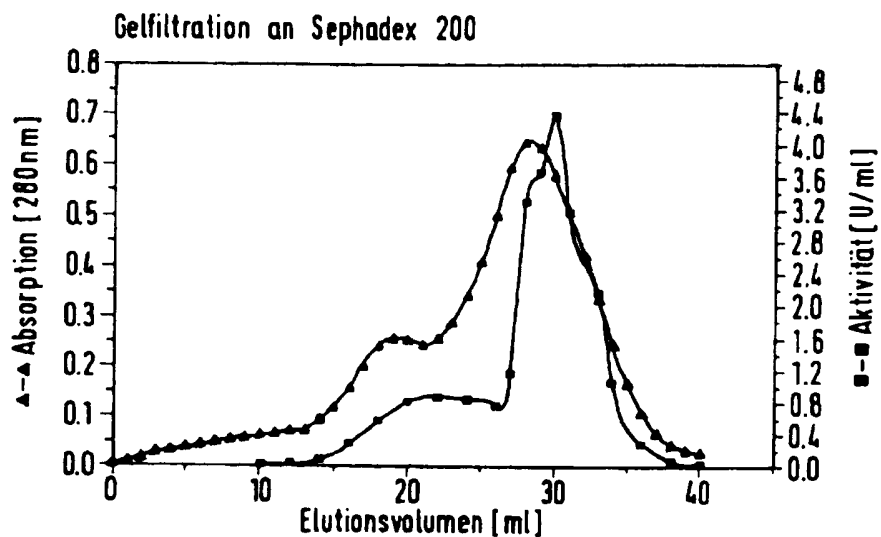
Spur 1 : E.coli BL21(DE3)pLysSpERJ-1 ohne IPTG, ohne Rifampicin
 Spur 2 : dito

Spur 3 : E.coli BL21(DE3)pLysSpT7-6 ohne IPTG, ohne Rifampicin
 Spur 4 : E.coli BL21(DE3)pERJ-2 ohne IPTG, ohne Rifampicin
 Spur 5 : E.coli BL21(DE3)pT7-6 ohne IPTG, ohne Rifampicin

Spur 6 : wie Spur 1, aber mit IPTG, ohne Rifampicin
 Spur 7 : wie Spur 2, aber mit IPTG, ohne Rifampicin
 Spur 8 : wie Spur 3, aber mit IPTG, ohne Rifampicin
 Spur 9 : wie Spur 4, aber mit IPTG, ohne Rifampicin
 Spur 10 : wie Spur 5, aber mit IPTG, ohne Rifampicin

Spur 11 : wie Spur 1, aber mit IPTG, mit Rifampicin
 Spur 12 : wie Spur 2, aber mit IPTG, mit Rifampicin
 Spur 13 : wie Spur 3, aber mit IPTG, mit Rifampicin
 Spur 14 : wie Spur 4, aber mit IPTG, mit Rifampicin
 Spur 15 : wie Spur 5, aber mit IPTG, mit Rifampicin

4/10



Gelvolumen: 115.5 ml, Tris-HCl/KCl (50 mM/150 mM), pH 8, 1 ml/min
 Probe: 2 ml mit 7,54 mg/ml UF-Konzentrat der G75 mit 17,68 U/ml

FIG. 5

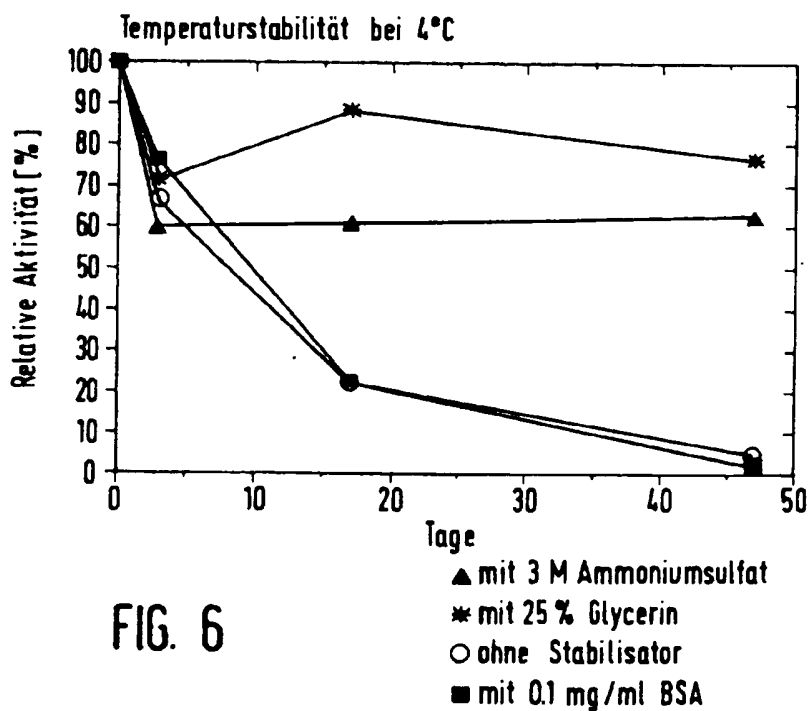


FIG. 6

5/10

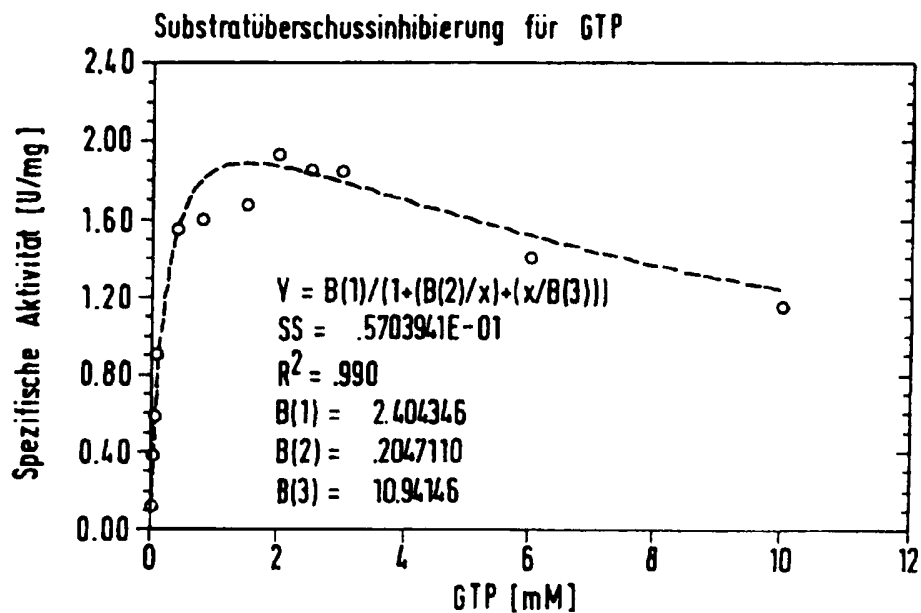


FIG. 7

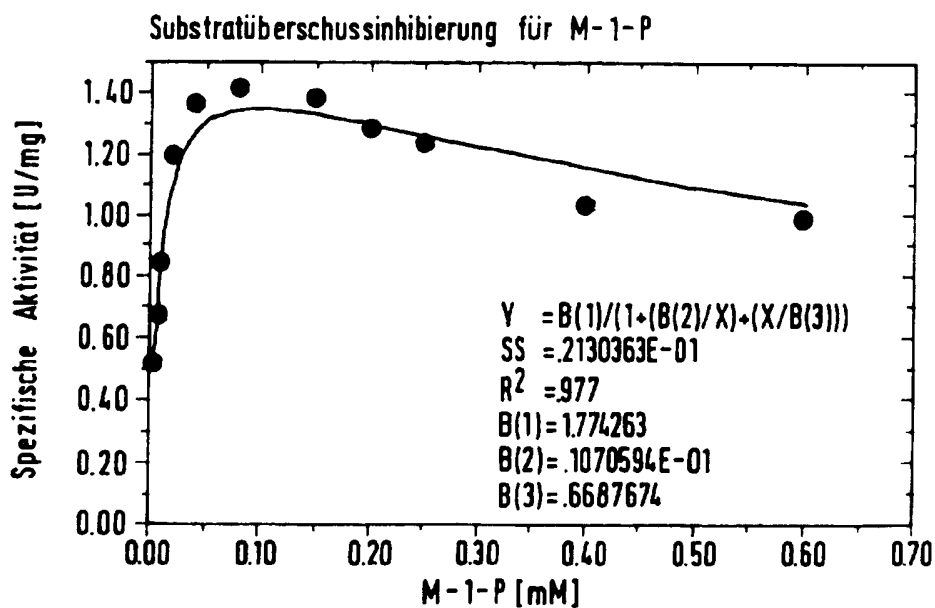


FIG. 8

6/10

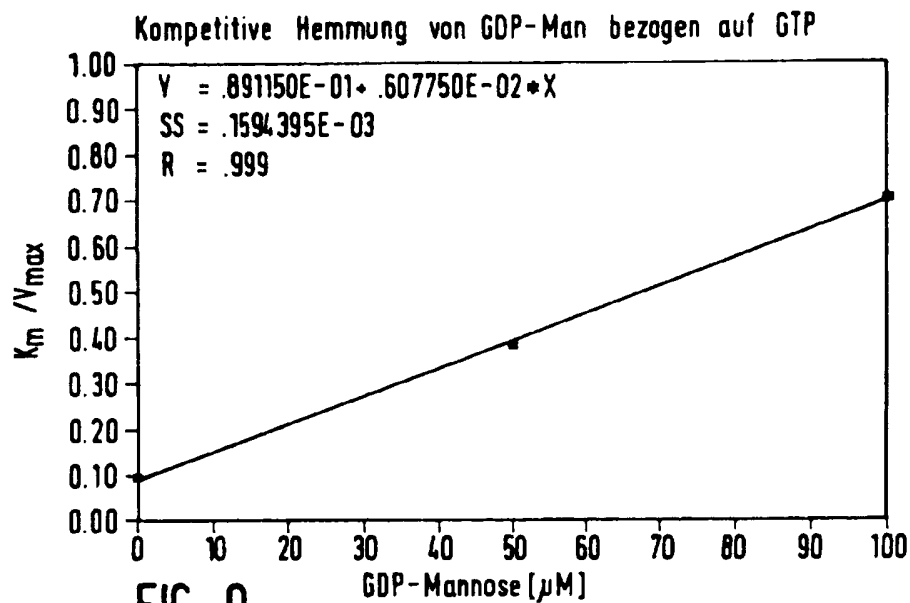


FIG. 9

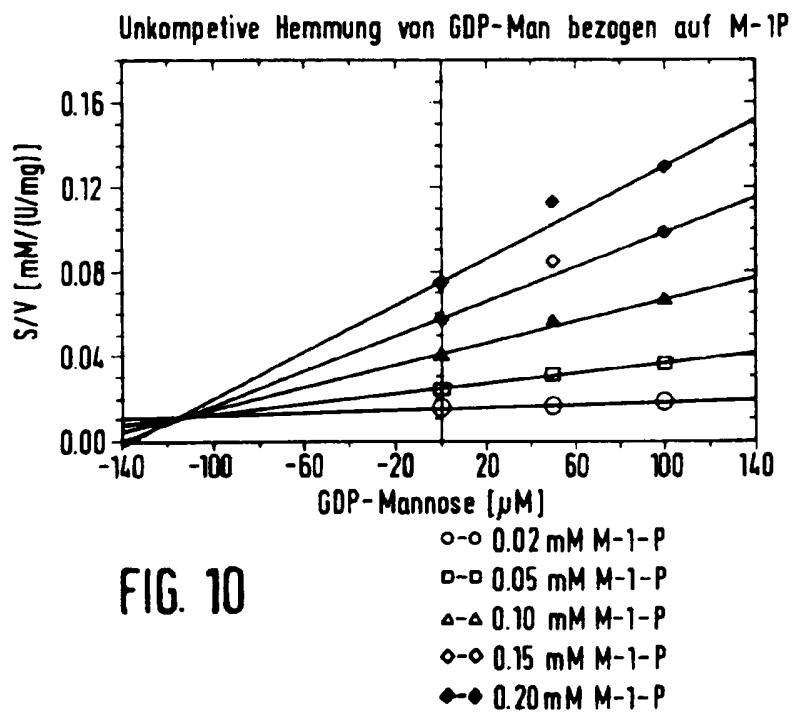


FIG. 10

7/10

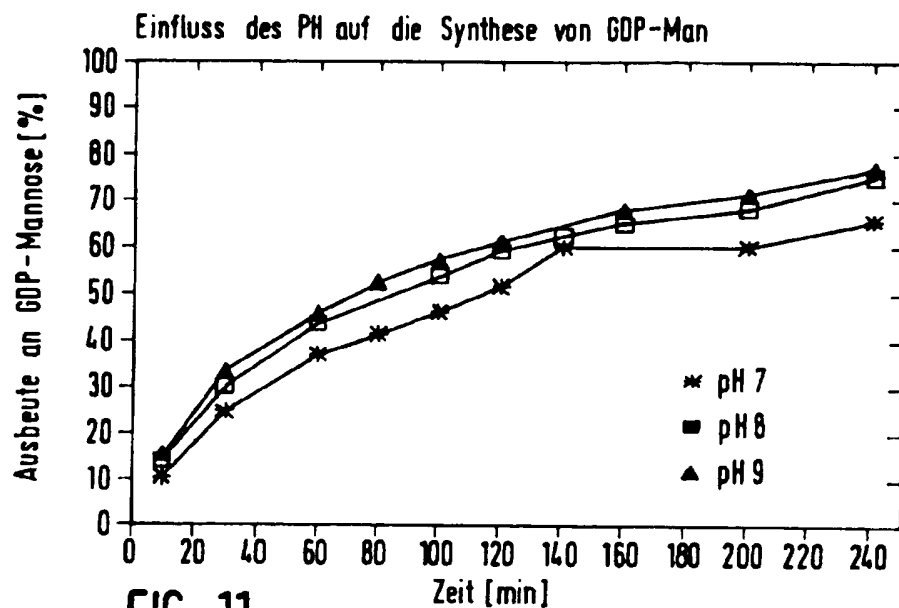


FIG. 11

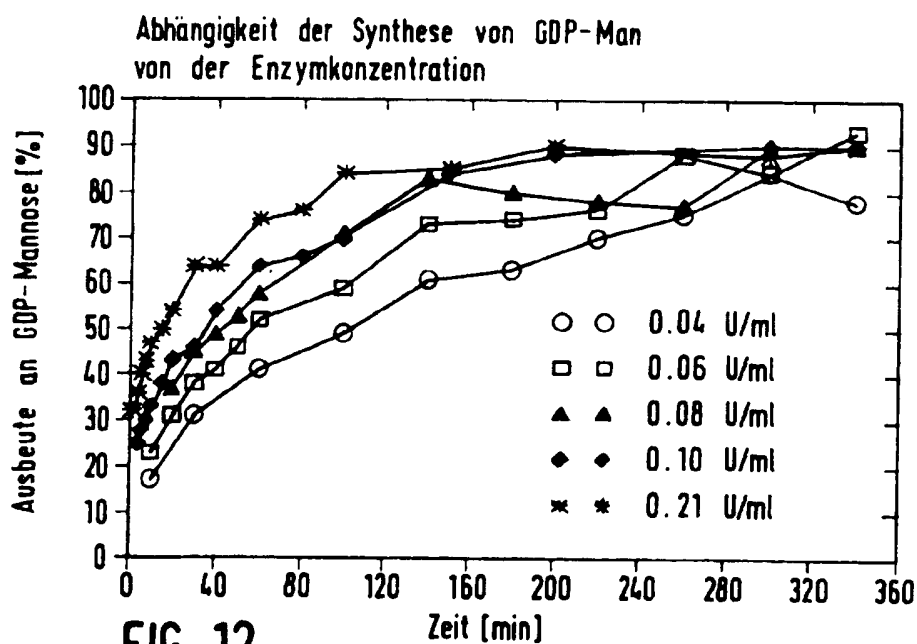


FIG. 12

8/10

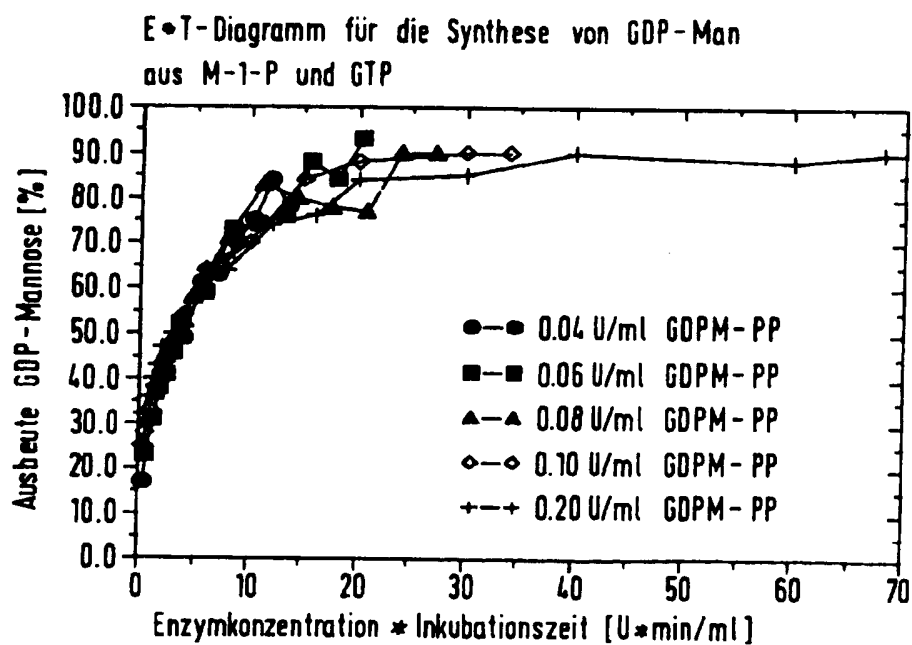


FIG. 13

Enzymatische Synthese von GDP- α -D-Mannose

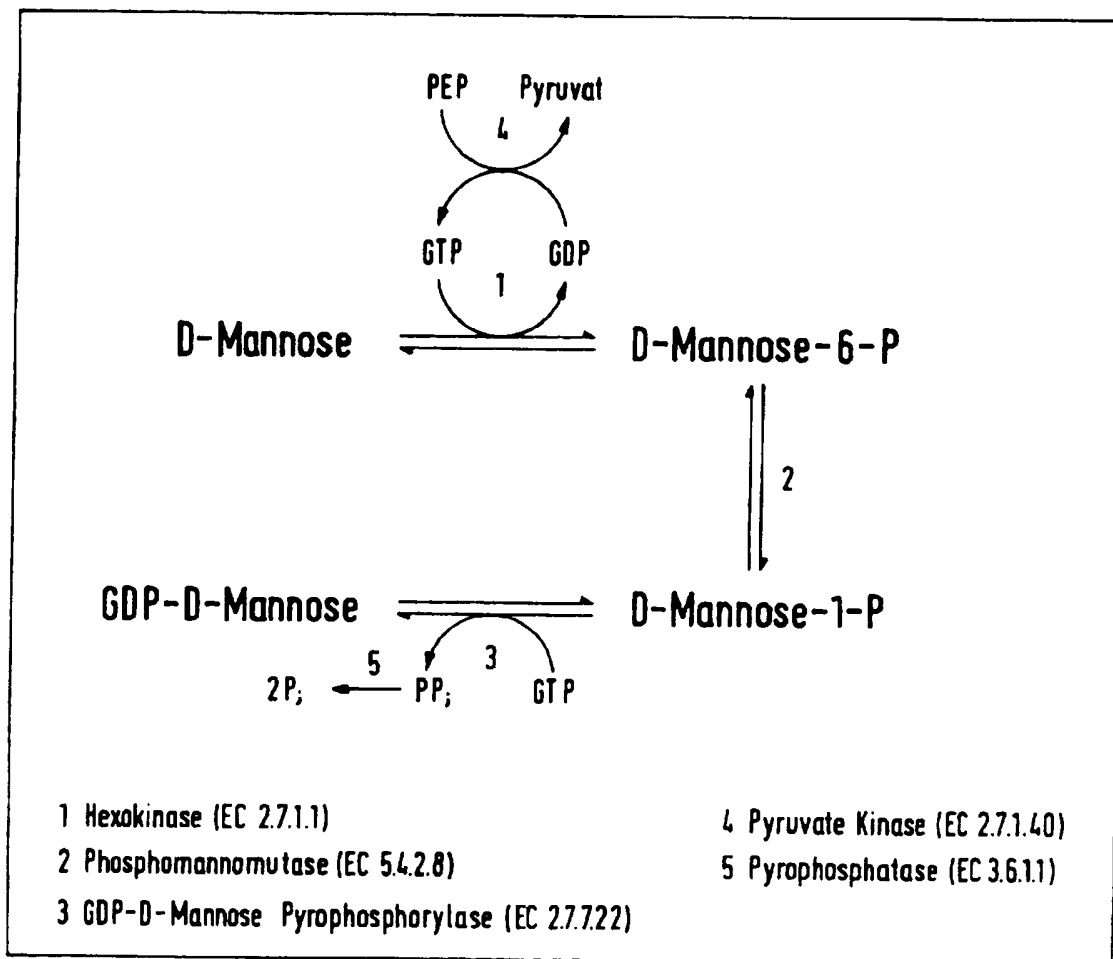
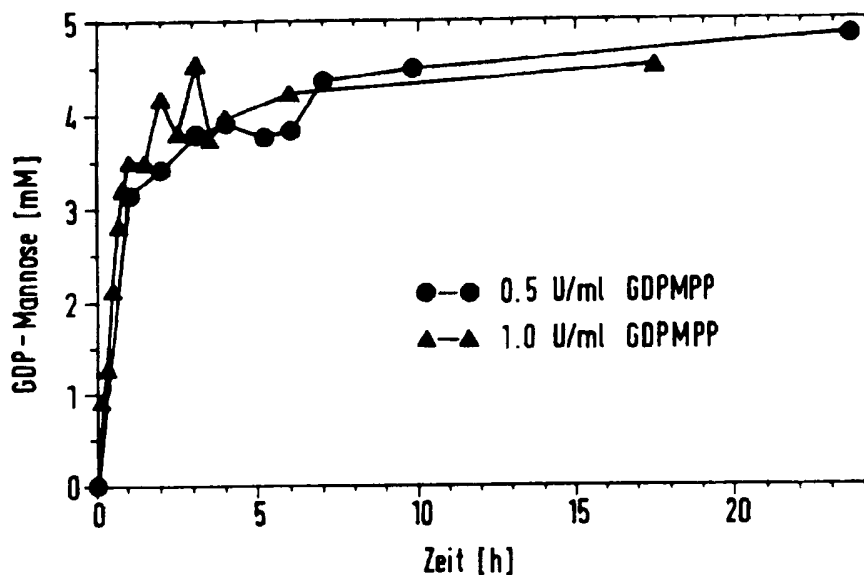


FIG. 14

10/10



Synthese von GDP-Mannose ausgehend von 5 mM Mannose und GTP

HK 1 U/ml; PMM 1 U/ml; PK 40 U/ml; P-Pase 2 U/ml; PEP 7.5 mM; GTP 5 mM;
 Mannose 5 mM; ATP 2 mM; Glc-1,6-P₂ 0.25 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 8; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM;
 Gesamtvolumen 2 ml

FIG. 15

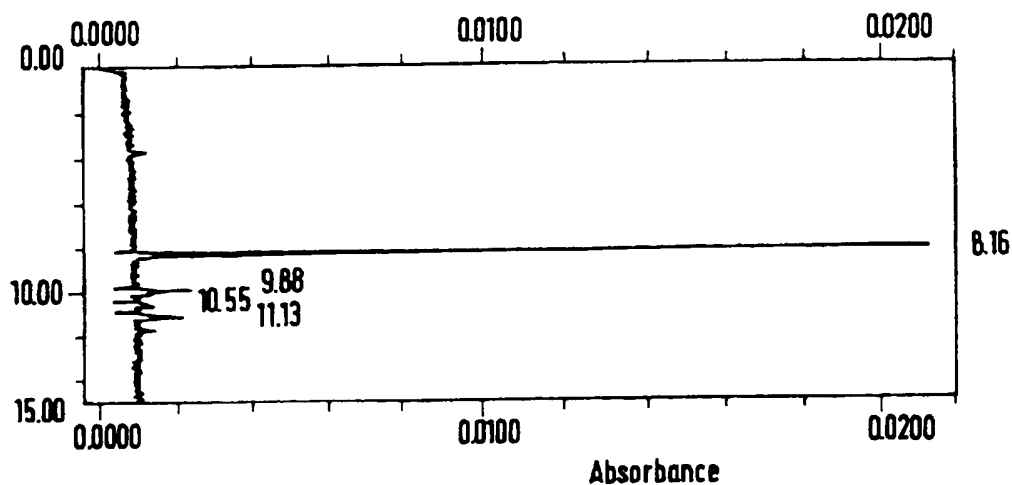


FIG. 16